09/956358
PCT/JP00/02596
20.04.00
4

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

REC'D 09 JUN 2000
WIPO PCT

出願年月日
Date of Application: １９９９年 ４月２３日

出願番号
Application Number: 平成１１年特許願第１１５７３７号

出願人
Applicant (s): 三菱化学株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

２０００年 ５月２６日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office 近藤隆彦

出証番号 出証特２０００－３０３７９３０

【書類名】　特許願

【整理番号】　98285M

【提出日】　平成11年 4月23日

【あて先】　特許庁長官　殿

【発明者】

【住所又は居所】　神奈川県横浜市青葉区鴨志田町１０００番地　三菱化学株式会社横浜総合研究所内

【氏名】　田川　俊明

【発明者】

【住所又は居所】　神奈川県横浜市青葉区鴨志田町１０００番地　三菱化学株式会社横浜総合研究所内

【氏名】　細川　斉子

【特許出願人】

【識別番号】　000005968

【氏名又は名称】　三菱化学株式会社

【代理人】

【識別番号】　100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】　今村　正純

【選任した代理人】

【識別番号】　100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】　塩澤　寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】　100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】　釜田　淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】　038357

【納付金額】　　21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】　　明細書　1

【物件名】　　図面　1

【物件名】　　要約書　1

【包括委任状番号】　9805687

【プルーフの要否】　　要

【書類名】　明細書

【発明の名称】　ポリアルキレングリコール結合リポソーム

【特許請求の範囲】

【請求項１】　脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質１モルに対して１５～５０モル％であるリポソーム。

【請求項２】　該リポソームが、マレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物とを反応させることにより得られるリポソームである、請求項１に記載のリポソーム。

【請求項３】　該化合物の結合量がマレイミド化脂質に対して１５～３０モル％である請求項１又は２に記載のリポソーム。

【請求項４】　該化合物がリポソームの表面に結合した請求項１ないし３のいずれか１項に記載のリポソーム。

【請求項５】　ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項１ないし４のいずれか１項に記載のリポソーム。

【請求項６】　該化合物が２つのポリエチレングリコール基を有する化合物である請求項５に記載のリポソーム。

【請求項７】　ポリエチレングリコールの分子量が２，０００～７，０００ダルトンである請求項５又は６に記載のリポソーム。

【請求項８】　ポリエチレングリコールの分子量が約５，０００ダルトンである請求項５又は６に記載のリポソーム。

【請求項９】　リポソームの表面にさらに抗体が結合した請求項１ないし８のいずれか１項に記載のリポソーム。

【請求項１０】　抗体がＧＡＨ抗体である請求項９に記載のリポソーム。

【請求項11】　抗腫瘍剤が封入された請求項１ないし１０のいずれか１項に記載のリポソーム。

【請求項12】　抗腫瘍剤がドキソルビシン又はその塩である請求項１１に記載のリポソーム。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明はリポソームに関するものである。より具体的には、ポリアルキレングリコールが結合されており、血中滞留性に優れたリポソームに関するものである。

【０００２】

【従来の技術】

薬剤を特定部位に大量に輸送する手段として、リポソームに薬剤を封入し、その表面に抗体を結合する方法が提案されている。特に、癌治療の分野において、抗腫瘍剤を封入した抗体結合リポソームの有効性が数多く報告されている（Konno et al., Cancer Tes., 47, 4471, 1987;特開昭58-134032号公報）。さらに、リポソームの問題点、すなわち封入物の漏出や、リポソームの凝集及び網内系器官での捕捉などを改善する方法として、リポソームにポリエチレングリコールを結合する方法が提案されている（特開平1-249717号公報、特開平2-149512号公報、Klibanovet, A.L. et al., FEBS Lett., 268, 235, 1990）。

【０００３】

特開平4-346918号公報には、薬剤を内包するリポソーム表面のマレイミド基と、各々のチオール基を介して結合する蛋白質及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物の残基を有することを特徴とする薬剤含有蛋白質結合リポソームが開示されている。このリポソームは、リポソーム表面のマレイミド基に対して、抗体に結合したチオール基とポリアルキレングリコール部分を含む化合物に結合したチオール基とを反応させることによって製造され、従来のリポソームでみられたような肝臓、脾臓などの網内系での非特異的取り込みが抑制されており、選択的な化学療法を達成できるという特徴がある。

【０００４】

上記公報には、リポソームに結合するポリアルキレングリコール部分を含む化合物の量は具体的に説明されていないが、マレイミド基（マレイミド化脂質）１モルに対して０．１％モルから２０％モルのチオール化抗体を反応させ、残存したマレイミド基に対して過剰量のチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物、好ましくは２倍等量以上を加え抗体結合ポリアルキレングリコール修飾

リポソームを得ることが記載されている（００１６段落）。また、実施例に具体的に記載されたリポソームの製造方法では、全脂質１００ｍｇに対して５μモルのチオール化ポリエチレングリコール部分を含む化合物（全脂質に対して３．１モル％）を反応させており、脂質に対して大過剰のチオール化ポリエチレングリコール部分を含む化合物を反応させることにより、理論量（リポソーム表面に残存したマレイミド基の量）のポリエチレングリコールで修飾されたリポソームを得ているものと考えられる。

【０００５】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

本発明者らは、特開平4-346918号公報に記載されたリポソームを基にして、さらに高い血中滞留性を有するとともに、安全性に優れたリポソームを提供すべく鋭意研究を行った。その結果、特開平4-346918号公報に記載されたリポソームにおいて、リポソームを修飾するポリアルキレングリコールの量を理論値（リポソーム表面に残存したマレイミド基の量）よりも低減させたところ、驚くべきことに、修飾量が理論値よりも少ないリポソームにおいても従来公知のリポソームとほぼ同等の血中滞留性が得られることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【０００６】

すなわち本発明は、脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該化合物の結合量がリポソームを構成するマレイミド化脂質１モルに対して１５～５０モル％であるリポソームを提供するものである。上記リポソームは、一般的には、リポソームに含まれるマレイミド化脂質のマレイミド基と、チオール基を付加したポリアルキレングリコール部分を含む化合物のチオール基とを反応させることによって製造することができる。

【０００７】

この発明の好ましい態様によれば、該化合物の結合量がマレイミド化脂質１モルに対して１５～３０モル％である上記リポソーム；該化合物がリポソームの表面に結合した上記リポソーム；ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコー

ルである上記リポソーム；該化合物が２つのポリエチレングリコール基を有する（２本鎖）化合物である上記リポソーム；ポリエチレングリコールの分子量が２，０００～７，０００ダルトン、好ましくは約５，０００ダルトンである上記リポソーム；リポソームの表面にさらに抗体が結合した上記リポソーム；抗体が抗腫瘍抗原抗体、好ましくはＧＡＨ抗体である上記リポソーム；及び、抗腫瘍剤、好ましくはドキソルビシン又はその塩が封入された上記リポソームが提供される。

【０００８】

【発明の実施の形態】

本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、天然レシチン（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン）やジパルミトイルフォスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジミリストイルフォスファチジルコリン（ＤＭＰＣ）、ジステアロイルフォスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）、ジオレオイルフォスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、ジパルミトイルフォスファチジン酸（ＤＰＰＡ）、ジパルミトイルフォファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジミリストイルフォスファチジン酸（ＤＭＰＡ）等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等の糖脂質、脂肪酸、両親媒性ジアルキルジメチルアンモニウム(dialkyl dimethylammnonium amphiphiles)、ポリグリセロールアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等（Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993）、アルキルグリコシド、アルキルメチルグルカミド、アルキルシュークロースエステル、ジアルキルポリオキシエチレンエーテル、ジアルキルポリグリセロールエーテル等（Liposome Technology,2nd edition, vol.1, 141, 1993）、ポリオキシエチレンーポリ乳酸等の両親媒性ブロック共重合体等（特表平6-508831号公報）などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらの脂質は単独で、又は２種以上を組み合わせて用いることができ、さらにコレステロール等の非極性物質、ＤＣ－ｃｈｏｌ（3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethyl)carbamoyl]cholesterol）等のコレステロール誘導体と

組み合わせ用いてもよい。

【０００９】

本発明のリポソームにおいては、ポリアルキレングリコールを含む化合物及び必要に応じて抗体などの蛋白質の結合のために、脂質成分の一部として、例えばマレイミド化フォスファチジルエタノールアミンなどのマレイミド化された脂質（本明細書において「マレイミド化脂質」と呼ぶ。）を用いる必要がある。全脂質に対するマレイミド化脂質の割合は、通常、約０．５～１０モル％である。

【００１０】

マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンの例で説明すると、この化合物は、アミノ基に反応性を有するマレイミド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）のアミノ基との反応により得られる。該マレイミド含有化合物はカプロイル基、ベンゾイル基、フェニルブチリル基等の残基を含んでいてもよく、例えば、Ｎ－（ε－マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミド、Ｎ－サクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート、Ｎ－サクシンイミジル４－（ｐ－マレイミドフェニル）プロピオネート、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミド等を挙げることができる。ＰＥとしてはジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＭＰＥ）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）等のフォスファチジルエタノールアミン類が使用できるが、好ましくはＤＰＰＥである。脂質成分として、さらにステアリルアミン、ジセチルフォスフェートなどの荷電性物質を含んでいてもよい。また、本発明のリポソームは、ウイルスの一部または全部を組み込んだ融合リポソーム、例えばセンダイウイルスとリポソームを融合したリポソームであってもよい。

【００１１】

典型的なリポソームとしては、例えば、フォスファチジルコリン１モルに対して、コレステロールを０．３～１モル、好ましくは０．４～０．６モル、マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンを０．０１～０．２モル、好ましくは０．０２～０．１モル、さらに好ましくは０．０２～０．０５モルを含む脂質組成物を用いることができ、フォスファチジン酸を加える場合には０．４モル以下、

好ましくは０．１５モル以下の脂質組成物を用いることができる。

【００１２】

本発明のリポソームの製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。また、本発明のリポソームの形態も特に限定されず、いかなる形態であってもよい。例えば、ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え、機械的振盪を加えて形成するマルチラメラリポソーム（ＭＬＶ）；超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法により得られるスモールユニラメラリポソーム（ＳＵＶ）；界面活性剤除去法、逆相蒸発法（リポソーム、砂本順三ら、南江堂、1998）、ＭＬＶを均一孔径を有するメンブランから加圧により押し出すイクストゥルージョン法等によって得られるラージユニラメラリポソーム（ＬＵＶ）のいずれであってもよい（Liposome Technology 2nd edition vol.1, 141, 1993）。リポソームの粒径は、例えば、３００ｎｍ以下、好ましくは３０から２００ｎｍ程度である。

【００１３】

本発明のリポソームには医薬を封入することができる。医薬の種類は特に限定されないが、例えば、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）等の抗腫瘍剤；チモロール等のアドレナリン遮断剤；クロニジン等の高血圧剤；プロカインアミド等の制吐剤；クロロキニーネ等の抗マラリア剤；並びにそれらの薬学的に許容し得る塩及び誘導体；レニウム１８６、ヨード１３１、イットリウム９０等の放射性物質；リシンＡ、ジフテリアトキシン、ＴＮＦなどの生理活性物質及びそれらをコードするＤＮＡなどを用いることができる。もっとも、本発明のリポソームに封入可能な医薬はこれらに限定されることはない。

【００１４】

上記医薬の薬学的に許容し得る塩としては、薬学的に許容し得る多価陰イオン性物質との塩、例えば、クエン酸塩、酒石酸塩、グルタミン酸塩、及びそれらの誘導体との塩が好ましい。本発明のリポソームに封入する医薬としては、抗腫瘍剤が好ましい。本発明のリポソームには、治療用の医薬のほか、診断用の医薬を封入することもできる。診断用の医薬としては、放射性元素、例えばインジウム、

テクネシューム等のイメージング薬剤；ヨード、ガドリニウム等の造影剤；ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ等の酵素；ユーロピウム誘導体などの蛍光体；Ｎ－メチルアクリジウム誘導体等の発光体などを挙げることができるが、これらに限定されるこはない。

【００１５】

このらの医薬をリポソームに導入する方法は特に限定されず、当業者に利用可能は方法はいずれも適用可能である。例えば、リポソーム形成時に水溶液として添加してリポソーム内部に封入してもよく、また、リポソーム形成後、ベシクル内外にｐＨ勾配などの濃度勾配を形成し、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な薬剤をリポソーム内部に取り込ませる方法（Cancer Res., 49, 5922, 1989; BBA, 455, 269, 1976）などを用いることができる。

【００１６】

本発明のリポソームは、特定量のポリアルキレングリコール部分を含む化合物で修飾されていることを特徴としている。ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリプロピレングリコールなどを用いることができるが、ポリエチレングリコールを用いることが好ましい。ポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量が２，０００～７，０００ダルトン程度のもの、好ましくは約５，０００ダルトン程度のものを用いることができる。

【００１７】

本発明のリポソームは、上記ポリアルキレングリコール部分を含む化合物がリポソーム表面のマレイミド化脂質にチオエーテル結合を介して結合した形態を有しているが、通常、ポリアルキレングリコールを含む化合物にチオール基を導入した後、この化合物をリポソームのマレイミド基と反応させることにより、ポリアルキレングリコールを結合させたリポソームを製造することができる。ポリアルキレングリコールを含む化合物としては、通常、ポリエチレングリコール基を有し、かつ末端をチオール化可能な化合物又は末端にメルカプト基を有する化合物を挙げることができる。具体的には、例えば、ポリアルキレングリコール基をトリアジンに結合した化合物、さらに該トリアジンがアミノ酸などにより置換され

た化合物を挙げることができる。この際、ポリアルキレングリコール基を２つ有する化合物（２本鎖）であってもよい。

【００１８】

ポリアルキレングリコールとしてポリエチレングリコールを用いる場合には、例えば、モノメトキシポリオキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸とを脱水縮合する方法；モノメトキシポリオキシエチレンアミンにＳＰＤＰでピリジルジチオプロピオニル基を導入し、さらに還元する方法；モノメトキシポリオキシエチレンアミンにイミノチオランによりチオール基を導入する方法；モノメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合させる方法；ポリエチレングリコールトリアジン誘導体をチオールアミンと縮合する方法などを利用することができる。さらに具体的には、2,4-ビス（ポチエチレングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化ＰＥＧ２（生化学工業株式会社製））をシスチンと反応させ、さらに還元してシステイン結合活性化ＰＥＧ２を得ることができる。

【００１９】

本発明のリポソームにおけるポリアルキレングリコール部分を含む化合物の導入量は、リポソームに含まれるマレイミド化脂質に対して、１５～５０モル％程度、好ましくは１５～３０モル％程度であり、全脂質に対して０．２８～０．９０モル％程度、好ましくは０．２８～０．５６モル％程度であり、ＤＰＰＣを用いる場合には、ＤＰＰＣに対して０．４４～１．４５モル％程度、好ましくは０．４４～０．８９モル％程度である。

【００２０】

本発明のリポソームは蛋白質で修飾されていてもよい。蛋白質としては、例えば、抗体、ＦＧＦ、ＥＧＦなどの種々の生理活性物質を用いることができるが、好ましくは抗体を用いることができる。抗体としては、抗体自体又は抗体フラグメント、又は抗体誘導体などを用いることができるが、抗体としては、抗体自体、又は抗体フラグメントのいずれを用いてもよい。本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗体自体及び抗体フラグメントのほか、誘導化又は修飾した抗体などを包含しており、最も広義に解釈しなければならない。また、抗体と

しては、治療対象となる組織、細胞、細菌、ウイルス等と反応性を有する抗体を利用することができる。例えば、各種動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒトーマウスのキメラ抗体、ヒトモノクローナル抗体などを用いることができる。異種動物の蛋白質ではない点から、ヒトモノクローナル抗体がより好ましい。抗体としては、特開平5-304987号公報に記載されたヒトモノクローナル抗体（ＧＡＨ抗体）を好適に用いることができ、例えば、上記公報の例７に具体的に示された方法に従って、ＧＡＨ抗体で修飾したリポソームを製造することができる。抗体の種類と封入すべき医薬との組み合わせを適宜選択することにより、治療効果に優れたリポソームを製造することができる。

【００２１】

蛋白質にチオール基を付与した後、リポソームのマレイミド基と該チオール基とを反応させることによって、リポソームを蛋白質で修飾することができる。蛋白質へのチオール基の付与は、蛋白質のアミノ基に対して、蛋白質のチオール化に通常用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ）プロピネート（ＳＰＤＰ）（Carlsson, J., et al., Biochem. J., 173, 723, 1978）やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート（Traut, R.R., et al., Biochemistry, 12, 3266, 1973）等の化合物を反応させる方法により行なうことができる。蛋白質が抗体である場合には、内在性ジチオール基を還元してチオール基として反応させることもでき、抗体活性の維持の点から内在性チオール基を用いる方法は好適である。

【００２２】

例えば、ＩｇＧを用いる場合はペプシン等の酵素でＦ（ａｂ′）$_2$化し、さらにジチオスレイトール等で還元して得られるＦａｂ′に生じるチオール基をリポソームとの結合反応に利用することができる（Martin, F.J., et al., Biochemistry, 20, 4229, 1981）。ＩｇＭの場合には、ミラーらの方法（J. Biol. Chem., 257, 286, 1965）に準じ、緩和な条件でＪ鎖を還元して得られるＩｇＭｓのＦｃ部分のチオール基をリポソームとの結合に利用すればよい。特開平5-304987号に記載されたＧＡＨ抗体を用いる場合には、Ｆ（ａｂ′）$_2$を用いることが好適である。チオール基が付与された抗体などの蛋白質とマレイミド基を含むリポソー

ムとの結合は、中性の緩衝液（ｐＨ６．５～７．５）中で２～１６時間反応させることにより達成される。

【００２３】

蛋白質とポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合されたリポソームを製造するためには、まず、マレイミド化脂質を含むリポソームに対して中性の緩衝液中でチオール化蛋白質を反応させる。チオール化抗体を例にとると、チオール化抗体をマレイミド化脂質１モルに対して、０．１モル％から２０モル％程度反応させればよい。ついで、マレイミド化脂質基１モルに対して、１５モル％から５０モル％、好ましくは１５～３０モル％（全脂質に対して０．２８～０．９０モル％、好ましくは０．２８～０．５６モル％、ＤＰＰＣを用いる場合には、ＤＰＰＣに対して０．４４～１．４５モル％、好ましくは０．４４～０．８９モル％）のチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を加え、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化合物が結合したリポソームを製造することができる。

【００２４】

本発明のリポソームの好ましい態様により、医薬、好ましくはドキソルビシンなどの抗腫瘍剤が封入されており、ポリエチレングリコール部分を含む化合物と抗腫瘍抗体とが結合したリポソームが提供される。上記の医薬含有リポソームは、公知の方法、例えば、脱水法（特表平2-502348号公報）、安定化剤を加え液剤として用いる方法（特開昭64-9331号公報）、凍結乾燥法（特開昭64-9931号公報）等により製剤化することができ、癌などの各種疾患の治療のために、血管内投与、膀胱内投与、腹腔内投与、局所投与などの方法で患者に投与することができる。投与量は有効成分の医薬の種類に応じて適宜選択することができるが、例えばドキソルビシンを封入したリポソームを投与する場合には、有効成分量として５０ｍｇ／ｋｇ以下、好ましくは１０ｍｇ／ｋｇ以下、より好ましくは５ｍｇ／ｋｇ以下で用いることができる。

【００２５】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の

実施例に限定されることはない。

参考例１

ジパルミトイルフォスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）／コレステロール／ε－マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（ＭＣ－ＤＰＰＥ）（１８／１０／０．５モル比）をクロロホルムに溶解し、ロータリーエバポレーターで減圧乾燥した。さらに真空ポンプで減圧して残存溶媒を除去した。得られた脂質フィルム１００ｍｇに対して１ｍＬの割合で０．３Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ４．０）を加え、６０℃で加温してボルテックスミクサーで振盪乳化してマルチラメラリポソーム（ＭＬＶ）を製造した。このＭＬＶをイクストゥルーダー（日油リポソーム社製）を用いて０．２μｍヌクレオポアメンブラン及び０．１μｍのヌクレオポアメンブレンを順次通過させて整粒し、ラージユニラメラリポソーム（ＬＵＶ）を得た。リポソーム外水相を１Ｎの水酸化ナトリウム水溶液で中和し、６０℃に加温しつつ２０ｍｇ／ｍｌのアドリアマイシン（ＡＤＭ）水溶液を脂質１００ｍｇに対して１０ｍｇの割合で添加した。９５％以上のＡＤＭがリポソーム内外のｐＨ勾配によりリポソームに装填された。さらに、未封入ＡＤＭをゲル濾過で除き、リポソーム外水相を１０％シュクロースに調製した。

【００２６】

参考例２

特開平５－３０４９８７号公報に記載のＧＡＨ抗体（胃癌反応性モノクローナル抗体）にイミノチオランを反応させて、チオール基を有する抗体をBiochemistry，12，3206，1973に記載の方法で調製した。また、2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンにシスチンを反応後、還元してチオール基を有するポリエチレングリコール（２本鎖型のＰＥＧ）を調製した。さらに、参考例１と同様にして調製したリポソームに上記のチオール化抗体とチオール化ＰＥＧを順次反応させて、抗体とＰＥＧを結合したリポソームを製造した。

【００２７】

例１：本発明のリポソームの製造

(1)リポソームの調製及び薬物の封入

ジパルミトイルフォスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）／コレステロール／ε－マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（ＭＣ－ＤＰＰＥ）（１８／１０／０．５モル比）からなる脂質混合物（１．６ｇ）に０．３Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ４．０）１６ｍＬを添加し、水和した後、液体窒素と６０℃の温浴で凍結融解を３回行ないマルチラメラリポソームを作製した。さらに押出し法により０．１μｍに整粒した。このリポソーム溶液に１ＭＮａＯＨを滴下して中和した後、６０℃に加温し、２０ｍｇ／ｍＬのドキソルビシン（ＤＸＲ）水溶液を脂質１００ｍｇあたり０．５ｍＬ添加して封入した。

【００２８】

(2)抗体のチオール化及びリポソームへの結合

１ｍＭＥＤＴＡを含む５０ｍＭリン酸緩衝液（ｐＨ７．５）に溶解したＧＡＨ抗体（特開平４－３４６９１８号公報、特開平５－３０４９８７号公報に記載のもの、３ｍｇ／ｍＬ、１４．４ｍＬ）に３ｍｇ／ｍＬのイミノチオランを９２．４μＬ添加し、３７℃で１時間反応させてチオール基を導入した。反応液をゲルろ過し、緩衝液を１ｍＭＥＤＴＡを含む０．１Ｍリン酸緩衝液（ｐＨ６．０）に交換した後、ドキソルビシン１ｍｇあたり０．２１ｍｇのチオール化抗体（１．７ｍｇ／ｍＬ）を加えて２５℃で１時間反応させ、リポソームに抗体を結合させた。

【００２９】

(3)ポリエチレングリコールのチオール化及びリポソームへの結合

特開平４－３４６９１８号公報の方法に従って、シスチンを用いてチオール化ＰＥＧ（２本鎖型、３０ｍｇ／ｍＬ、ＰＥＧ分子量２０００の２本鎖型（ＰＥＧ２０００）又はＰＥＧ分子量５０００の２本鎖型（ＰＥＧ５０００））を製造し、上記の反応液１ｍＬあたり０．１８ｍＬ添加して、１０℃で結合反応を行なった。反応開始後５～２４０分後にサンプリングしてセファロースＣＬ６Ｂカラムにアプライし、未反応のチオール化ＰＥＧを除いて反応を停止し、ＰＥＧ量の異なるイムノリポソームを作製した。ＰＥＧ非結合イムノリポソームは、ＰＥＧ結合操作をしていないイムノリポソームを同様にセファロースＣＬ６Ｂでゲルろ過することで作製した。

【００３０】

(4)結合ＰＥＧ量の定量

イムノリポソームに結合したＰＥＧ量はＨＰＬＣ法により測定した。終濃度２％ＳＤＳ溶液としたイムノリポソーム溶液を６０℃で３０分間加温し、リポソームを完全に可溶化した。ＧＰＣカラム（東ソー株式会社製、２０００ＳＷＸＬ）を用い、ｐＨ７．５の緩衝液（２５ｍＭNaH_2PO_4、０．１％ＳＤＳ、７０％メタノール）で溶離してＰＥＧを分離し、２１５ｎｍで検出してエリア値から定量した。

(5)ＤＸＲ定量

サンプル５０μＬを５０％プロパノール／０．５Ｍ塩酸９５０μＬに添加し、５００ｎｍの吸光度を測定してＤＸＲを測定した。

【００３１】

(6)結合抗体量の定量

ＰＥＧ量の定量と同様にして、ＧＰＣカラム（東ソー株式会社製、３０００ＳＷＸＬ）を用い、ｐＨ７．０の緩衝液（２５ｍＭNaH_2PO_4、２００ｍＭNa_2SO_4、０．１％ＳＤＳ）で溶離して抗体を分離し、抗体ピークの２８０ｎｍで検出されるエリア値から定量した。

(7)脂質量

脂質（ＤＰＰＣ及びコレステロールの総量）はＨＰＬＣ法により定量した。Ｌ－カラムＯＤＳ（化学品検査協会）４．６ｍｍ×２５０ｍｍに負荷し、テトラヒドロフラン（ＴＨＦ）／アセトニトリル／水（２：１：１、Ｖ／Ｖ／Ｖ、０．１％トリフルオロ酢酸）で溶離した。２１５ｎｍで検出を行ない、ＤＰＰＣに由来するピーク及びコレステロールに由来するピークのエリア値から定量した。脂質定量用サンプルはリポソームサンプル１容に対して上記溶離液９容を加えて調製した。

【００３２】

例２：本発明のリポソームの体内動態

例１の方法に従って、リポソームを構成する全脂質１モルに対して０～約０．７モル％、ＤＰＰＣ１モルに対して０～約１モル％、マレイミド化脂質１モルに対

して０～約４０モル％のＰＥＧを導入したリポソーム（ＤＸＲ封入、抗体非結合、ＰＥＧ２０００又はＰＥＧ５０００）を調製した。

【００３３】

【表１】

リポソーム	ＤＸＲ濃度 (mg/ml)	ＰＥＧ量*	ＰＥＧ量**	ＰＥＧ量***
1	1.14	0.083(PEG5000)	0.13	4.61
2	1.17	0.22 (PEG5000)	0.34	12.2
3	1.27	0.40 (PEG5000)	0.63	22.2
4	1.32	0.48 (PEG5000)	0.75	26.7
5	1.16	0.096(PEG2000)	0.15	5.33
6	1.08	0.30 (PEG2000)	0.47	16.7
7	1.47	0.60 (PEG2000)	0.94	33.3
8	1.55	0.70 (PEG2000)	1.09	38.9
9	3.49	-	-	-

*　全脂質に対するモル％

**　ＤＰＰＣ１モルに対するモル％

***マレイミド化脂質ＤＰＰＥ１モルに対するモル％

【００３４】

ＢＡＬＢ／ｃＡｊｃｌ雄性マウス（６週齢）を実験に使用した。各リポソームについて１群４匹とし、ブランクとして非処理マウス１匹を実験に供した。ＤＸＲ量として２ｍｇ／ｋｇとなるように尾静脈内にリポソームを投与した。投与１６時間後、マウスにネンブタール注射液（大日本製薬株式会社製）を腹腔内投与し、麻酔下に開胸して採血し、血漿を分離してＤＸＲの分析に供した。

【００３５】

血漿１００μＬに０．３Ｍ塩酸－５０％エタノール（塩酸エタノール）１ｍＬを加え、６０℃で１０分間加熱してＤＸＲを抽出し、４℃に冷却して１５０００ｒｐｍで１０分間遠心して上清を採取した。この試料を塩酸エタノールで４倍に希釈し、励起波長４９０ｎｍ、蛍光波長５９０ｎｍの蛍光を測定した。塩酸エタノールで希釈した既知濃度のＤＸＲを用いて検量線を作製し、血漿中のＤＸＲを定量した。なお、マウス血漿からのＤＸＲ回収率は、ＤＸＲ換算３．７５μｇ／ｍＬ～３０μｇ／ｍＬの範囲において９５～９８％であった（参考文献：Cancer R

es., 47, 4471, 1989）。

【００３６】

各リポソーム群についての血漿中ＤＸＲ濃度の平均値（±標準偏差）を図１に示す。リポソームの血中滞留性の指標となる血漿中ＤＸＲ濃度は、ＰＥＧ５０００及びＰＥＧ２０００ともに、リポソームに結合したＰＥＧ量に依存して増加することが確認された。

【００３７】

例３：本発明のリポソームの体内動態

例１の方法に従って、リポソーム全脂質に対して０～０．６モル%、ＤＰＰＣに対して０～約１モル%、マレイミド化ＤＰＰＥに対して０～約３０モル%のＰＥＧを導入したリポソーム（ＤＸＲ封入、抗体結合、ＰＥＧ５０００結合）を調製した。

【００３８】

【表２】

リポソーム	ＤＸＲ濃度 (mg/100mg脂質)	抗体 (mg/100mg脂質)	ＰＥＧ量*	ＰＥＧ量**	ＰＥＧ量***
1	10.2	1.5	0	0	0
2	10.4	1.6	0.06	0.10	3
3	10.3	1.6	0.10	0.16	5
4	10.3	1.6	0.15	0.24	8
5	11.1	1.6	0.28	0.44	15
6	10.5	1.6	0.30	0.48	16
7	10.2	1.6	0.36	0.56	19
8	11.0	1.8	0.48	0.76	26
9	10.8	1.3	0.52	0.82	28
10	10.8	1.7	0.61	0.97	33

*　全脂質に対するモル%

**　ＤＰＰＣ１モルに対するモル%

***マレイミド化ＤＰＰＥ１モルに対するモル%

【００３９】

例２と同様にして血漿中のＤＸＲを定量した。各リポソーム群についての血漿中ＤＸＲ濃度の平均値（±標準偏差）を図２に示す。血漿中ＤＸＲ濃度は、リポソ

ームに結合したＰＥＧ量に依存して増加したが、全脂質に対して約０．３モル％、ＤＰＰＣに対して約０．５モル％、マレイミド化ＤＰＰＥに対して約１７モル％の導入量でプラトーに達することが確認できた。なお、リポソームからＤＸＲが漏れた場合には、漏出したＤＸＲは血中から速やかに焼失することが確認されているので、例２及び例３の結果に示された血漿中ＤＸＲ濃度は、リポソームに封入されたＤＸＲに由来するものであると考えられる。

【００４０】

【発明の効果】

本発明のリポソームは、優れた血中滞留性を有しており、しかもポリアルキレングリコールの結合量が従来のリポソームに比べて少ないという特徴がある。したがって、本発明のリポソームは、ポリアルキレングリコールに起因する副作用を回避することができ、また、工業生産性の観点からも有利である。

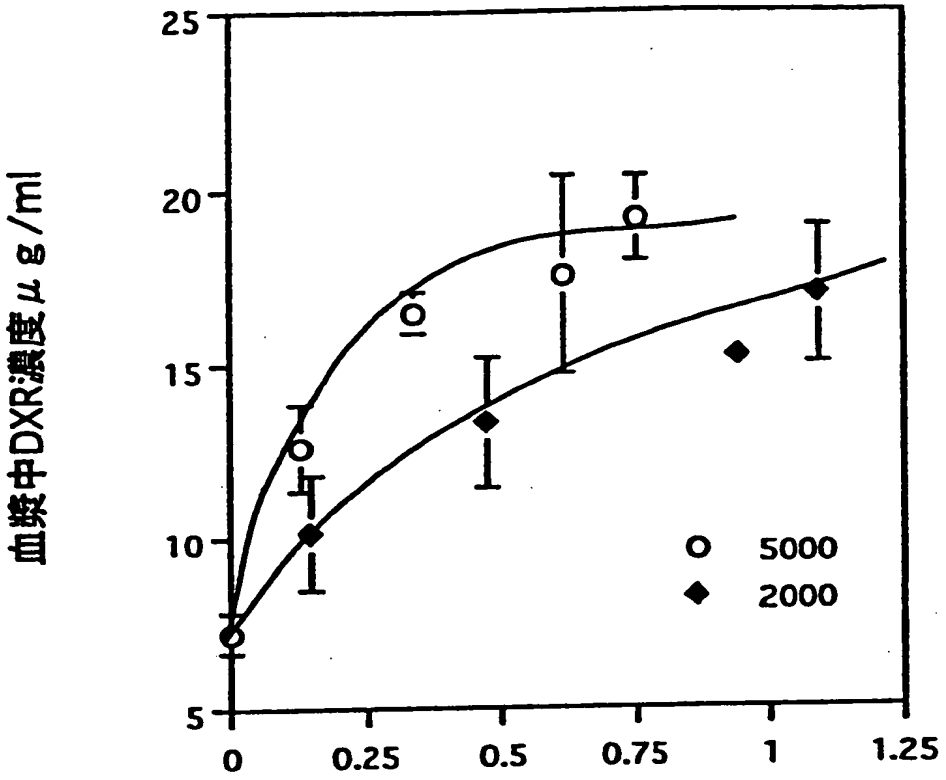
【図面の簡単な説明】

【図１】　リポソーム（ＤＸＲ封入、抗体非結合）に結合したポリエチレングリコール量と血漿中ＤＸＲ濃度との関係を示した図である。横軸はＰＥＧ量（ＤＰＰＣ１モルに対するモル％）を示す。全脂質に対するモル％及びＤＰＰＥ１モルに対するモル％の換算値は、それぞれ０．１６及び８．９（０．２５）；０．３２及び１７．８（０．５）；０．４８及び２６．７（０．７５）；０．６４及び３５．６（１）；並びに０．８１及び４５（１．２５）である（カッコ内はＤＰＰＣ１モルに対するモル％を示す）。

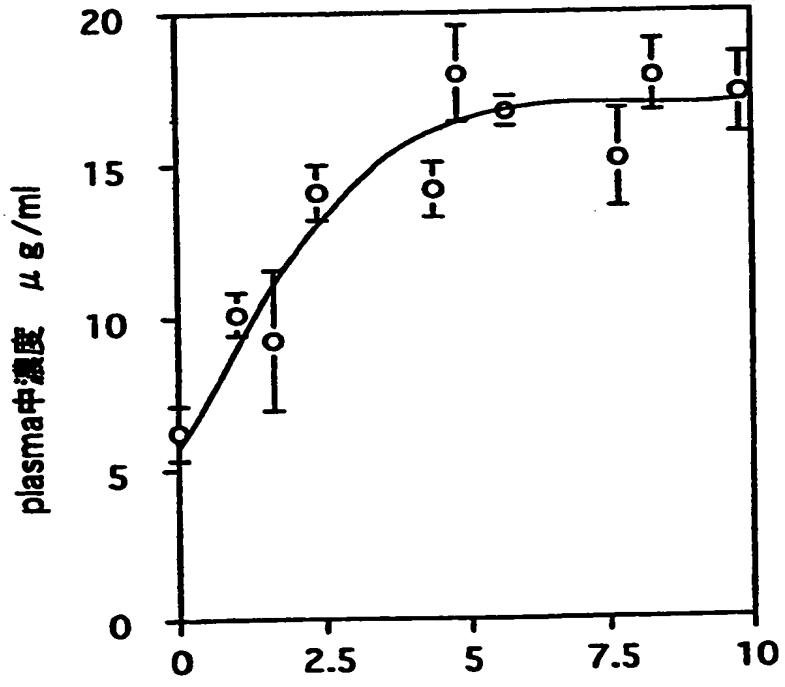
【図２】　リポソーム（ＤＸＲ封入、抗体結合）に結合したポリエチレングリコール量と血漿中ＤＸＲ濃度との関係を示した図である。横軸はＰＥＧ量（１００ｍｇ脂質に対するＰＥＧ量(ｍｇ)）を示す。ＤＰＰＣ１モルに対するモル％、全脂質に対するモル％、及びマレイミド化ＤＰＰＥ１モルに対するモル％の換算値は、それぞれ０．２５、０．１６、及び８（２．５）；０．５０、０．３１、及び１７（５）；０．７５、０．４７、及び２６（７．５）；並びに１．０、０．６２、及び３４（１０）である（カッコ内は１００ｍｇ脂質に対するＰＥＧ量（ｍｇ）を示す）。

【書類名】　　図面

【図１】


血漿中DXR濃度μg/ml
25
20
15
10
5
0
0.25
0.5
0.75
1
1.25
5000
2000

【図２】


plasma中濃度　μg/ml
20
15
10
5
0
0
2.5
5
7.5
10

【書類名】　　要約書

【要約】

【課題】　ポリアルキレングリコールが結合されており、血中滞留性に優れたリポソームを提供する。

【解決手段】　脂質末端の一部がマレイミド化されたリポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物をチオエーテル基を介して結合したリポソームであって、該化合物の結合量がリポソームに含まれるマレイミド化脂質１モルに対して１５～５０モル％であるリポソーム。

【選択図】　なし

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　〔０００００５９６８〕

１．変更年月日　　１９９４年１０月２０日
　［変更理由］　　名称変更
　　住　所　　東京都千代田区丸の内二丁目５番２号
　　氏　名　　三菱化学株式会社